

B9



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Off nl gungsschrift
⑩ DE 42 16 321 A 1

②① Aktenzeichen: P 42 16 321.8
②② Anmeldetag: 16. 5. 92
②③ Offenlegungstag: 18. 11. 93

⑤① Int. Cl.⁵:
C 12 N 15/11
C 12 N 15/87
C 12 N 15/63
C 07 K 13/00
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/50
G 01 N 33/483
// C 12 N 15/10, 15/79,
15/88

DE 42 16 321 A 1

⑦① Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

⑦② Erfinder:
Bach, Alfred, Dr., 6900 Heidelberg, DE; Herb, Anne,
6900 Heidelberg, DE; Monyer, Hannah, Dr., 6900
Heidelberg, DE; Seeburg, Peter H., Prof. Dr., 6900
Heidelberg, DE

⑤④ Untereinheiten von NMDA-Rezeptoren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

⑤⑦ Die Erfindung betrifft neue Untereinheiten für NMDA-Rezeptoren und für sie codierende DNA-Sequenzen, sowie Herstellverfahren für DNA-Sequenzen und Rezeptoren. Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zur Identifizierung funktionaler Liganden für diesen Rezeptor.

DE 42 16 321 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft 3 neue Untereinheiten von NMDA-Rezeptoren ihre Verwendung sowie Verfahren zum Auffinden von funktionellen Liganden für diese Rezeptoren.

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. An der glutamatergen Neurotransmission sind mindestens fünf verschiedene Rezeptorsubtypfamilien beteiligt: NMDA, Kainat, AMPA/Quisqualat, AP4 und der metabotrope Glutamatrezeptor (TIPS 11, 1990, 126-32, Pharmacological Reviews, 40, No 2, 1989, 143-210). Glutamatrezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Ca^{++} -Homöostase neuronaler Zellen.

Glutamat ist involviert in eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge. Bei den pathophysiologischen Situationen sind insbesondere Epilepsie, Schizophrenie, neurodegenerative Erkrankungen und ischämische Zustände unterschiedlicher Genese zu nennen. Bei den physiologischen Vorgängen ist vor allem an die kognitiven Funktionen wie z. B. Lernen zu denken. Rezeptoren für Glutamat sind infolgedessen interessante Angriffsorte für Pharmaka zur Behandlung der o. g. pathologischen Zustände.

In ihrer Primärstruktur aufgeklärt sind bislang einige Untereinheiten von AMPA- und Kainatrezeptoren, eine Untereinheit eines NMDA-Rezeptors (NRI) sowie einige metabotrope Rezeptoren (Nature 342, 643, 1989, Science 249, 556, 1990, Neuron 8, 169, 1992).

Es wurden nun neue Untereinheiten von NMDA-Rezeptoren der Ratte gefunden, sowie DNA-Sequenzen, die für solche Untereinheiten codieren.

In Fig. 1 ist die cDNA-Sequenz von NR2A und die davon abgeleitete Polypeptidsequenz dargestellt; in Fig. 2 und 3 die entsprechende Struktur von NR2B und NR2C.

Weitere geeignete DNA-Sequenzen sind solche, die zwar eine andere Nukleotidsequenz als die in Fig. 1, 2 oder 3 aufgeführte besitzen, die aber infolge der Degeneration des genetischen Codes für die in Fig. 1, 2 oder 3 aufgeführte Polypeptidkette oder Teile davon codieren. Weiterhin sind solche DNA-Sequenzen geeignet, die für NMDA-Rezeptoruntereinheiten codieren und die unter Standardbedingungen mit der in Fig. 1, 2 oder 3 dargestellten Nukleotidsequenz oder mit einer Nukleotidsequenz, die für das in Fig. 1, 2 oder 3 dargestellte Protein codiert, hybridisieren. Unter Standardbedingungen sind beispielsweise Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 und 1-SSC (1-SSC: 0,15M NaCl, 15mM Natriumnitrat pH 7,2) zu verstehen. Die experimentellen Bedingungen für DNA-Hybridisierung sind in Lehrbüchern der Gentechnik, beispielsweise in Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben.

Weiterhin wurden gentechnische Herstellverfahren für diese Untereinheiten gefunden. Außerdem wurde gefunden, daß sich die für diese Rezeptor-Untereinheiten kodierenden DNA-Sequenzen zum Auffinden von funktionellen Liganden für diese Rezeptoren verwenden lassen. Gegenstand der Erfindung sind darüber hinaus Verfahren zur Identifizierung funktioneller Liganden für NMDA Rezeptoren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß man mit Sequenzen, welche für NMDA-Rezeptor-Untereinheiten codieren, Zellen transfiziert, die Membranen dieser Zellen isoliert und mit diesen Membranen übliche Rezeptorbindungsexperimente durchführt. Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren zur Identifizierung funktioneller Liganden für NMDA Rezeptoren ist dadurch gekennzeichnet, daß man in Zellen, welche mit DNA-Sequenzen transfiziert wurden, die für NMDA-Rezeptor-Untereinheiten codieren, Änderungen der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration nach Ligandenbindung mit fluorimetrischen Methoden detektiert.

Die neuen Polypeptide und DNA-Sequenzen lassen sich gentechnisch unter Verwendung bekannter Methoden herstellen. So kann man aus Hirngewebe mRNA isolieren und in doppelsträngige cDNA übersetzen. Diese cDNA kann als Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden. Durch die Verwendung spezifischer Primer kann so unter geeigneten Reaktionsbedingungen die entsprechende cDNA amplifiziert werden. Durch die Verwendung geeigneter Primer kann die amplifizierte cDNA ohne vorherige Klonierung sequenziert werden. Die doppelsträngige cDNA kann auch in λ Vektoren z. B. λ gt 10 oder λ ZAP integriert werden um eine hirnspezifische cDNA Bank zu generieren. Eine solche cDNA Bank kann mit radioaktiv markierten DNA- oder RNA-Sonden durchgesucht werden, um Klone zu identifizieren, die Homologie mit der Hybridisierungsprobe aufweisen. Die dabei verwendeten Methoden sind beispielsweise in "Current Protocols in Molecular Biology" (Hrsg. F.M. Ausubel et al.) 1989, ISBN 0-471 50338-x (Vol. 1 u. 2), für die Polymerase-Kettenreaktion in Saiki et al. (1985) Science, 230, 1350-54 bzw. Mullis and Faloona (1988) Meth. Enzymol., 155, 335-350 beschrieben.

Die so charakterisierte cDNA ist mit Hilfe von Restriktionsenzymen leicht zugänglich. Die dabei entstehenden Fragmente, ggf. in Verbindung mit chemisch synthetisierten Oligonukleotiden, Adaptoren oder Genfragmenten, können benutzt werden, um die für das Protein codierende Sequenzen zu klonieren. Der Einbau der Genfragmente bzw. synthetischen DNA-Sequenzen in Klonierungsvektoren, z. B. die handelsüblichen Plasmide M13mp18 oder Bluescript, erfolgt in bekannter Weise. Auch können die Gene oder Genfragmente mit geeigneten chemisch synthetisierten oder aus Bakterien, Phagen, Eukaryontenzellen oder deren Viren isolierten Kontrollregionen versehen werden, die die Expression der Proteine in unterschiedlichen Wirtssystemen ermöglichen.

Die Transformation bzw. Transfektion geeigneter Wirtsorganismen mit Hybridplasmiden ist ebenfalls bekannt und eingehend beschrieben (M. Wigler et al., Cell, 16 (1979), 777-785; F.L. Graham and A.J. van der Eb, Virology, 52 (1973), 456-467).

Bei der Expression in Säugerzellen kann man Vektoren verwenden, die das zu exprimierende Gen, in diesem Fall die für die hier beschriebenen Untereinheiten von NMDA Rezeptoren codierenden cDNA-Sequenzen, unter die Kontrolle des Maus-Metlothionein-, des viralen SV40- oder des Cytomegalievirus-Promotors setzen (J. Page Martin, Gene, 37 (1985), 139-144). Notwendig für die Expression ist das Vorliegen des Methionin-Startcodons des Gens, das für diese Untereinheiten v n NMDA Rezeptoren codiert. Man isoliert dann Klone, die

Kopien dieser Vektoren als Episome oder ins Genom integriert besitzen. Besonders vorteilhaft ist die Integration des Fremdgens in einen Vektor, der den Promoter des Cytomegalievirus enthält.

Alternativ dazu kann man Zellen mit einem geeigneten Vektor derart transfizieren, daß die transiente Expression der so eingebrachten DNA für eine pharmakologische Charakterisierung der exprimierten heterologen Polypeptide ausreicht. Auch hier ist die Kontrolle der Expression durch den Promoter des Cytomegalievirus besonders vorteilhaft.

Weiterhin kann man funktionelle NMDA-Rezeptoren dadurch herstellen, daß man eine oder mehrere DNA-Sequenzen aus der Gruppe NR2A, NR2B und NR2C zusammen mit der DNA-Sequenz für NR1 (Nature, 354, 31 (1991)) in Zellen transfiziert. Auf diese Art lassen sich NMDA-Rezeptoren mit unterschiedlichen Untereinheiten gewinnen.

In Verbindung mit prokaryontischen Sequenzen, die für die Replikation in Bakterienzellen und eine Antibiotika-Resistenz kodieren, ist die Verwendung von "shuttle"-Vektoren gut geeignet. Konstruktionen und Vermehrung des Plasmids erfolgen zunächst in Bakterienzellen; anschließend erfolgt die Umsetzung in die Eukaryontenzellen, z. B. in die embryonale menschliche Nieren-Zelllinie HEK 293.

Auch andere Zellsysteme, z. B. Hefe und andere Pilze, Insektenzellen sowie tierische und humane Zellen wie z. B. CHO-, COS- und L-Zellen, können in Verbindung mit geeigneten Expressionsvektoren zur Expression der klonierten cDNA verwendet werden.

Die eukaryontischen Expressionssysteme besitzen den Vorteil, daß sie in der Lage sind, ihre Produkte effektiv und meist in nativer Form zu exprimieren. Ferner besitzen sie die Fähigkeit, ihre Produkte posttranslational zu modifizieren.

Die exprimierten Rezeptorproteine können durch Detergenzien solubilisiert werden und durch Affinitätschromatographie nach bekannten Verfahren gereinigt werden. Das reine Polypeptid kann, nach Kristallisation und Röntgen-Strukturanalyse oder anderen physikalischen Verfahren wie NMR oder Raster-Tunnelmikroskopie, dazu benutzt werden, die räumliche Struktur der Liganden-Bindungsstelle aufzuklären.

Die exprimierten Rezeptorproteine können nach entsprechender Reinigung auch als Antigene für die Generierung polyklonaler oder monoklonaler Antikörper dienen. Diese Antikörper wiederum können gegebenenfalls für diagnostische Zwecke verwendet werden. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für solche Antikörper besteht in ihrer Verwendung als Hilfsmittel zum rationalen Drug Design. So können die Rezeptor-spezifischen Antikörper als Antigen für die Generierung anti-idiotypischer Antikörper eingesetzt werden. Solche Antikörper können für definierte Bereiche ein Abbild des Rezeptors darstellen und für das Screening nach spezifischen Rezeptorliganden oder für das rationale Drug Design verwendet werden.

Rezeptor exprimierende Zelllinien stellen ein wichtiges Instrument im Screening nach spezifischen Rezeptorliganden dar. Dazu können die Membranen dieser Zellen für Rezeptorbindungstest verwendet werden. Informationen über Wirkungsweise (Agonismus/Antagonismus) eines Rezeptorliganden können dadurch gewonnen werden, daß man Zellen, die mit einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz transfiziert worden sind, mit einem geeigneten Reportersystem versieht. Geeignete Reportersysteme sind solche, bei denen ein Promotor, der durch Verbindungen des Signaltransduktionswegs (second messenger) reguliert wird, mit einem Gen für ein leicht nachzuweisendes Produkt wie Luciferase funktionell verbunden ist. Solche Reportersysteme sind beispielsweise aus Science 252, 1424 (1991) oder Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5061 (1991) bekannt. Ein geeigneter Promotor, der beispielsweise durch die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration reguliert wird, ist der des fos-Gens. Auch ist es möglich, Änderungen der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration mit Fluoreszenzfarbstoffen z. B. FURA 2AM) direkt nachzuweisen.

Weiterhin kann der Stromfluß durch die Zellmembran in Abhängigkeit von der Ligandenbindung gemessen werden.

Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes ist es möglich, andere DNA-Sequenzen als hier beschreiben, z. B. chemisch synthetisierte Gene mit unterschiedlicher DNA-Sequenz für die Expression der beschriebenen Untereinheiten von NMDA Rezeptoren der Ratte zu benutzen.

Mit Hilfe der Erfindung wird es möglich, Substanzen zu identifizieren und zu charakterisieren, die an den hier beschriebenen Rezeptor binden und dort agonistisch oder antagonistisch wirken.

Weitere Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Beispielen näher beschrieben.

Für gentechnische Methoden sei dazu z. B. auf das Handbuch von Sambrook et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, oder "DNA cloning", Vol. I bis III, IRI Press 1985 bis 1987, Herausgeber D.M. Glover, hingewiesen.

Beispiel

Isolierung von cDNA-Molekülen, die für NMDA Rezeptoruntereinheiten der Ratte kodieren

0,5 g Großhirn einer Ratte wurden in 6 M Guanidiniumthiocyanat, 5 mM Natriumcitrat (pH 7,0), 0,1 M 2-Mercaptoethanol, 0,5% Sarcosyl im ULTRA-TURRAX aufgeschlossen. Grobe Zelltrümmer wurden bei 3000 U/min im Sorvall SS34 Rotor abzentrifugiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation durch ein 5,7-M-CsCl-Kissen 12 Stunden bei 45 000 U/min abgetrennt. Anschließend wurde die PolyA⁺-enthaltende RNA-Fraktion durch Affinitätschromatographie an oligo(dT)-Cellulose abgetrennt.

Mit Hilfe des Enzyms AMV-Reverse Transcriptase und oligo(dT)₁₂₋₁₈ als Starter wurde die polyA⁺-RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Die Synthese des zweiten Stranges erfolgte mit Ecoli-DNA-Polymerase I. An die doppelsträngige cDNA wurde mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase ein EcoRI Adaptor mit folgender Sequenz angesetzt: 5'AATT CCATGGATGCATGC 3'. Der kommerziell erhältliche Phagenvektor λ gt 10 wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI linearisiert. Phagen-DNA und cDNA wurden miteinander ligiert und

mit einem kommerziell erhältlichen Verpackungsextrakt (Promega) zu infektiösen Phagen verpackt. Die rekombinanten Phagen wurde mit Ecoli C 600 Hfl auf NZYDT-Platten (GIBCO/BRL) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die so erhaltene cDNA-Bibliothek enthielt $2 \cdot 10^6$ unabhängige Klone. Nach Amplifikation der cDNA-Bibliothek entsprechend herkömmlicher Methoden wurden 500 000 Phagen mit C 600 Hfl Zellen ausplattiert. Die Phagen wurden auf Nitrocellulose-Filter übertragen, mit 0,5 N NaOH / 1,5 M NaCl lysiert und die denaturierte DNA durch 2-stündiges Backen bei 80°C fest an das Filter gebunden. Die Filter wurden in 6-SET-Puffer (1-SET = 0,15 M NaCl, 15 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA), 0,1% SDS und 5-Denhardt's Lösung (100-Denhardt = 1 g Ficoll, 1 g Polyvinylpyrrolidon, 1 g BSA pro 50 ml) für 4 h bei 68°C vorhybridisiert.

Hybridisiert wurde mit einer Nick-translatierten cDNA-Probe, die folgendermaßen hergestellt wurde:

Zwei degenerierte Oligonukleotide wurden von Peptidregionen abgeleitet, die innerhalb bekannter Glutamat-rezeptor-Untereinheiten stark konserviert sind.

Diese Oligonukleotide hatten folgende Sequenz:

(A) 5' -GCGAATTCTGGAA (C, T) GG (C, A) TGATGGG (G, A, T, C) GA-3'
 (B) 5' -GCGGTACCAA (A, G) GC (A, T, G) CCA (A, G) (A, G) TT (A, T, G) GC (A, T)
 GT (A, G) T-3'

Sie korrespondieren mit den Peptidregionen WNGHHGEI (ca. 60 Aminosäurereste vom N-terminalen Ende der I. Transmembranregion entfernt) und YTANLAAF (am C-terminalen Ende der III. Transmembranregion). Diese Oligonukleotide wurden als Primer in der Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Als Template wurden 20 ng doppelsträngige Rattenhirn cDNA (s. o.) eingesetzt. Die Primerkonzentration betrug 1 mM, das Reaktionsvolumen 50 mM. Die Reaktionsbedingungen waren: 10 mM Tris/HCl, pH 8,7, 50 mM KCl, 2,5 MgCl₂, jeweils 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Es wurde 1 Einheit der *Thermus aquaticus* DNA Polymerase (Perkin-Elmer/Cetus) zugegeben. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt mit folgendem Temperaturprofil: 94°C 30 Sekunden, 55°C 40 Sekunden, 72°C 1 Minute. Verwendet wurde der Thermocycler 9600 von Perkin-Elmer. Die amplifizierte DNA (ca. 500 Basenpaare) wurde entsprechend der Herstellerangaben unter Verwendung des TA Cloning Kits (Invitrogen) in den Vektor pCR 1000 einkloniert und vermehrt.

Zur radioaktiven Markierung wurde das einklonierte Amplifikationsprodukt mit Hilfe der Restriktionsenzyme Eco RI und Hind III wieder freigesetzt durch Elektrophorese im Agarosegel vom Vektor abgetrennt und mit Hilfe des GeneClean II Kits (aus dem Gel) eluiert. Die Nick-Translation wurde mit dem Nick-Translations-Kit der Firma Boehringer Mannheim entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Verwendet wurde α (³²P)-dCTP von Amersham Buchler mit einer spezifischen Aktivität von > 3000 Ci/mmol. Die Nick-translatierte DNA hatte eine spezifische Aktivität von $5 \cdot 10^8$ dpm/ μ g DNA.

Die Nitrocellulose-Filter, an denen die Phagen-DNA haftete (s. o.), wurden in einer Lösung, die 5-SET, 0,1% SDS, 30% Formamid, 5-Denhardt's, 10% Dextransulfat und die Nicktranslatierte Probe mit einer Konzentration von 10^6 dpm/ml enthielt, 16 Stunden bei 42°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden sie viermal in 2-SET/0,1% SDS bei 42°C für 20 Minuten gewaschen, angetrocknet und einem Röntgenfilm exponiert. Klone, die beim "Screening" eine radioaktive Antwort gaben, wurden isoliert und weitergezüchtet, um die entsprechende Phagen-DNA zu gewinnen.

Phagen-DNA wurde durch Inkubation der gereinigten Phagen mit Proteinase K (ad 60 μ g/ml) bei 55°C für 1 h und anschließender Phenol/Chloroformextraktion präpariert. Nach Zugabe von 3 Volumen Ethanol (-20°C) fiel die Phagen-DNA aus und wurde mit einer sterilen Injektionsnadel in 70%iges Ethanol überführt, gewaschen und kurz sedimentiert. Nach kurzem Trocknen des Pellets an der Luft wurde es in TE-Puffer suspendiert.

Beispiel 2

Herstellung von einzelsträngiger DNA, die für Untereinheiten des NMDA-Rezeptors der Ratte kodiert

Ausgangspunkt waren die in Beispiel 1 beschriebenen Phagen-DNA-Sequenzen. Sie wurden jeweils einzeln präparativ mit dem Restriktionsenzym Eco RI geschnitten. Die Eco RI-Fragmente, welche die cDNA-Insertionen enthielten, wurden elektrophoretisch aus dem Gel eluiert. Jeweils 30 ng dieser Fragmente wurden bei 4°C für 12 h mit 100 ng des Eco RI geschnittenen, kommerziell erhältlichen Klonierungsvektors M13mp18 oder M13mp19 ligiert. Das Volumen des Ligationsansatzes betrug 10 μ l. Die Ligation wurde durch 5 minütiges Erhitzen auf 80°C beendet.

1/10 Volumen eines jeden Ligationsansatzes wurde zur Transformation von 100 μ l kompetenten JM 101 Zellen eingesetzt. Nach Beendigung der Transformation wurden dem Transformationsansatz 60 μ l 0,2 M IPTG-Lösung und 120 μ l XGal (20 mg/ml) zugesetzt. Dieser Ansatz wurde in NZYDT-Topagar auf NZYDT-Agarplatten mit 200 μ l JM 101 Zellen (OD₆₀₀ = 1) ausplattiert. Das Medium NZYDT ist kommerziell erhältlich (GIBCO-BRL). Klone, welche cDNA-Insertionen enthielten, konnten aufgrund fehlender Blaufärbung der Plaques identifiziert werden. Die Sequenzanalyse dieser Klasse zeigte, daß 3 neue Untereinheiten eines Rezeptors gefunden wurden, die Homologie mit einer NMDA Rezeptor-Untereinheit des NMDA Rezeptors aufweisen.

Die Klone, welche für die neuen NMDA Rezeptor-Untereinheiten kodierten, wurden mit NR2A, NR2B und NR2C bezeichnet. Ihre DNA- und die davon abgeleiteten Proteinsequenzen sind in den Figuren 1-3 dargestellt.

Beispiel 3

Transiente Expression der klonierten Ratten-Rezeptorgene in HEK 293 Zellen

Wenn nicht anders beschrieben, wurde die Zellkultur nach Lindl und Bauer, "Zell- und Gewebekultur" Gustav Fischer Verlag, durchgeführt. 5

Doppelsträngige M 13 mp 18 DNA, welche NMDA-Rezeptor kodierende cDNA aus Beispiel 2 als Insertion enthielt, wurde mit den Enzymen EcoRI und HindIII gespalten. Das daraus resultierende, für den Rezeptor kodierende DNA-Fragment mit überhängenden Enden wurde mit Hilfe der Enzyme T₄-DNA-Polymerase und Klenow-Fragment der E. coli DNA Polymerase nach Standardbedingungen (Current Protocols in Molecular Biology s. o.) behandelt, um glatte Enden zu generieren. Danach wurden an dieses Fragment die kommerziell erhältlichen Linker (Invitrogen) mit der Sequenz 5'-CTTAGAGCAC-3' 3'-GAATCTC-5' ligiert. Das mit diesen Linkern versehene DNA-Fragment wurde unter Standardbedingungen in die kommerziell erhältlichen, BstXI geschnittenen Vektoren pCDM8 und RC/CMV (Invitrogen) ligiert. Die daraus resultierenden rekombinanten Plasmide wurden in bekannter Weise vermehrt. 10 15

HEK 293 Zellen wurden unter Standard-Bedingungen in einer 10-cm-Zellkulturschale bis zu einer Zellzahl von 7 bis 8 · 10⁶ Zellen kultiviert. Nach Trypsinierung wurden die Zellen 1:3 in MEM Medium (Gibco), das 2,2 g/l NaHCO₃ enthielt, verdünnt und erneut in 10 cm Petrischalen ausgesät. Danach wurden die Zellen für 40 bis 48 h bei 37°C kultiviert.

Die zu transfizierende DNA wurde wie folgt vorbereitet: 20 µg der DNA-Lösung (1 mg/ml), gereinigt über CsCl-Gradient, wurden mit 437 µl H₂O versetzt, danach wurden 62,5 µl 2 M CaCl₂ zugesetzt und schließlich 500 µl BBS. Innerhalb von 10 min bildeten sich bei Raumtemperatur Ca⁺⁺-Präzipitate. 20

Die Lösung wurde auf eine 10-cm-Zellkulturschale mit den nach obiger Vorschrift kultivierten HEK 293 Zellen gegeben. Nach vorsichtiger Durchmischung wurden die Zellen 15 bis 20 h in einem Inkubator bei 37°C/3% CO₂ kultiviert. Danach wurden vorsichtig 5 ml serumfreies Medium zugesetzt. Nach Entfernung des gesamten Mediums und Wiederholung des Waschvorgangs mit 5 ml serumfreiem Medium wurden den Zellen 10 ml Vollmedium zugesetzt. Nach 48 h Inkubation mit 5% CO₂ konnten die Zellen für pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen verwendet werden. 25

Alternativ wurde die DNA auch Liposomen-vermittelt in die Zellen eingebracht. Dabei wurde Lipofectin der Firma GIBCO-BRL den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. 30

Beispiel 4

Expression der NMDA Rezeptor-Untereinheiten in Oozyten

Zur Herstellung von cRNA wurden die entsprechende cDNA, welche für die NMDA-Rezeptor-Untereinheiten kodiert, in das mit EcoRI gespaltene Plasmid Bluescript (Stratagene) nach Standard-Protokollen inkloniert. Die cDNAs wurden durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym EcoRI aus der oben beschriebenen λ Phagen-DNA freigesetzt und elektrophoretisch gereinigt. 35

Nach Vermehrung der Bluescript-Klone, welche für Untereinheiten des NMDA Rezeptors codieren, wurde nach Standard-Methoden Plasmid-DNA gewonnen. Diese Plasmid DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Not I gespalten und zur in vitro Transkription eingesetzt. Die Transkription wurde von dem T3 oder T7 Promotor gestartet und unter Standard-Bedingungen entsprechend dem in vitro Transkriptionskit von Stratagene durchgeführt. 40

Zur Expression der Rezeptoruntereinheiten wurden 10 ng cRNA der (NR2A, NR2B oder NR2C) entweder einzeln oder in Kombination mit NR1 (Nature, 354, 31 (1991)) in Oozyten injiziert, die aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* explantiert worden waren (C. Methfessel et al., Pflügers Arch. 407, 577, (1986)). Die Oozyten wurden in OR-2 (92,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0,5 g/l Polyvinylpyrrolidon, pH 7,2 mit dem Zusatz von 4 µg/ml Zinacef und 100 U/ml Penstrep) bei 19°C inkubiert. 24 Stunden nach der Injektion wurden die Oozyten mit Kollagenase (Typ II Sigma) behandelt (1 mg/ml in OR-2 für 1 Stunde). Elektrophysiologische Ableitungen wurden 2–6 Tage nach Injektion der cRNA vorgenommen. Dabei wurde eine 2 Elektroden-"Voltage clamp" Konfiguration benutzt mit einem TEC 01C Amplifier (NPI Electronic, Tamm, Deutschland). Während der elektrophysiologischen Messungen wurden die Oozyten mit normaler Frosch Ringerlösung NFR (115 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,2) perfundiert. 45 50 55

Beschreibung der Fig. 1–3

Fig. 1 cDNA-Sequenz der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2A (5146 Nukleotide). Der für den Rezeptor codierende Teil erstreckt sich von Pos. 432 bis 4823; unter der DNA-Sequenz ist die Polypeptidsequenz im Ein-Buchstaben-Code dargestellt (1446 Aminosäuren). 60

Fig. 2 cDNA-Sequenz der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2B (5359 Nukleotide). Der für den Rezeptor codierende Teil erstreckt sich von Pos. 857 bis 5359; unter der DNA-Sequenz ist die Polypeptidsequenz im Ein-Buchstaben-Code dargestellt (1482 Aminosäuren).

Fig. 3 cDNA-Sequenz der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2C (4738 Nukleotide). Der für den Rezeptor codierende Teil erstreckt sich von Pos. 674 bis 3559; unter der DNA-Sequenz ist die Polypeptidsequenz im Ein-Buchstaben-Code dargestellt (962 Aminosäuren). 65

Patentansprüche

1. DNA-Sequenzen die für NMDA-Rezeptoruntereinheiten codieren und die aus der Gruppe, die von
 - a) DNA-Sequenzen der in Fig. 1, 2 oder 3 beschriebenen Struktur,
 - b) DNA-Sequenzen, die für Proteine mit der in Fig. 1, 2 oder 3 beschriebenen Struktur codieren, und
 - c) DNA-Sequenzen, die unter Standardbedingungen mit DNA-Sequenzen a) oder b) hybridisieren und nicht für NR1 codieren, gebildet wird, ausgewählt sind.
2. Verfahren zur gentechnischen Herstellung von NMDA-Rezeptoruntereinheiten unter Verwendung von DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1.
3. Verwendung von DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 zur Identifizierung funktionaler Liganden für NMDA-Rezeptoren.
4. Verfahren zur Identifizierung funktionaler Liganden für NMDA-Rezeptoren, dadurch gekennzeichnet, daß man mit einer für einen NMDA-Rezeptor codierenden DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 Zellen transfiziert, die Membranen dieser Zellen isoliert und mit diesen Membranen übliche Rezeptorbindungsexperimente durchführt.
5. Verfahren zur Identifizierung funktionaler Liganden für NMDA-Rezeptoren, dadurch gekennzeichnet, daß man mit einer für einen NMDA-Rezeptor codierenden DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 Zellen transfiziert und die in diesen Zellen durch Bindung der Liganden an den Rezeptor verursachte Veränderung des second messenger Spiegels durch ein Reportersystem detektiert.

Hierzu 19 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Figur 1

10 30 50
GCAGGAGCAGGACTGCGAGAGGGTGTCCAGGAGCGCTCAGAGGACCGGCGTCGCTGTCC
70 90 110
GGAGTGGAAACAGAAAGCTGAGCCAGGGCTCTAGAAGAGAGGCTCCTGAGGTGCTGTGCCT
130 150 170
GAGCATGGGGCTGGATGAGGTCTGAGAGTCCGGCGGCGAGCAATCAGCCCTGGAGATGAC
190 210 230
CAGGGGTGGCCACTGCTGAGAACTATGTGGAGAGAGGCTCCGAGCCCTGCTGCAGAGCCT
250 270 290
CCGGCTGGGATAGCCGCCCCCGTGGGGGTGATGCGGACAGCGGGGACAGCCAGGGGAG
310 330 350
CGCGCGGGGCGCGCAGCATGCCGGAACCCGCTAAACCTGGTGGCTGCTGAGGCGGCCGAG
370 390 410
ATGCTCGTGCGCGCAGCACGCCCCATTGCATCCTCCACCTTCTCCGGCTACAGGGACCCT
430 450 470
AAGTGGCGACCATGGGCAGATTGGGCTACTGGACCTTGCTGGTATTGCCGGCCCTTCTGG
M G R L G Y W T L L V L P A L L V
490 510 530
TCTGGCGCGATCCGGCGCAGAACGCGGCGCGGAGAAGGGTCCTCCAGCGCTGAACATTG
W R D P A Q N A A A E K G P P A L N I A
550 570 590
CGGTGCTGCTGGGTACAGCCACGACGTGACAGAACGCGAACTTCGAAATCTGTGGGGCC
V L L G H S H D V T E R E L R N L W G P
610 630 650
CAGAGCAGGCAACCGGCTTGCCCTGGATGTGAACGTGGTGGCGTTATTGATGAACCGCA
E Q A T G L P L D V N V V A L L M N R T
670 690 710
CTGACCCTAAGAGCCTCATCACGCATGTGTGCGACCTCATGTCCGGGGCGCGCATCCACG
D P K S L I T H V C D L M S G A R I H G
730 750 770
GCTTGGTGTGTTGGAGATGACACGGACCAGGAGGCTGTGGCCAGATGCTGGATTTTATCT
L V F G D D T D Q E A V A Q M L D F I S
790 810 830
CCTCACAGACTTTTATCCCCATCTTGGGCATTTCATGGGGGTGCATCTATGATCATGGCTG
S Q T F I P I L G I H G G A S M I M A D
850 870 890
ACAAGGATCCGACATCCACGTTCTTCCAGTTTGGAGCCTCCATCCAGCAGCAAGCCACAG
K D P T S T F F Q F G A S I Q Q Q A T V
910 930 950
TTATGCTGAAGATCATGCAGGACTACGACTGGCACGTCTTCTCCCTGGTCCACCACCATCT

Figur 1 Forts.

M L K I M Q D Y D W H V F S L V T T I F
 970 990 1010
 TCCCTGGCTACCGAGACTTCATCAGCTTTATCAAGACAACAGTGGACAACAGCTTTGTGG
 P G Y R D F I S F I K T T V D N S F V G
 1030 1050 1070
 GCTGGGATATGCAGAACGTGATCACACTGGACACCTCCTTCGAGGACGCCAAGACGCAGG
 W D M Q N V I T L D T S F E D A K T Q V
 1090 1110 1130
 TCCAGCTGAAGAAGATCCATTCTTCTGTCTATCCTGCTCTACTGCTCCAAAGACGAGGCTG
 Q L K K I H S S V I L L Y C S K D E A V
 1150 1170 1190
 TCCTCATCCTGAGCGAGGCTCGCTCCCTCGGCCTCACTGGCTATGATTTCTTCTGGATTG
 L I L S E A R S L G L T G Y D F F W I V
 1210 1230 1250
 TCCCCAGTTTGGTGTCTGGGAACACAGAGCTCATCCCCAAGAGTTTCCATCAGGTCTCA
 P S L V S G N T E L I P K E F P S G L I
 1270 1290 1310
 TTTCACTCTCTTATGACGACTGGGACTACAGCCTGGAGGCAAGAGTGAGAGACGGTCTTG
 S V S Y D D W D Y S L E A R V R D G L G
 1330 1350 1370
 GGATCTTAACCACTGCCGCATCCTCCATGTTGGAGAAGTTCTCCTACATTCTCTGAGGCCA
 I L T T A A S S M L E K F S Y I P E A K
 1390 1410 1430
 AGGCCAGCTGCTATGGGCAGGCAGAGAAGCCAGAGACCCCGCTACACACCCTGCACCAAT
 A S C Y G Q A E K P E T P L H T L H Q F
 1450 1470 1490
 TCATGGTCAATGTGACTTGGGATGGCAAGGACTTGTCTTCACTGAGGAAGGTTACCAGG
 M V N V T W D G K D L S F T E E G Y Q V
 1510 1530 1550
 TGCACCCCAAGGCTTGTGGTGATCGTGCTGAACAAGGACCGGGAGTGGGAAAAGGTGGGCA
 H P R L V V I V L N K D R E W E K V G K
 1570 1590 1610
 AGTGGGAGAACCAGACGCTGAGCCTGAGGCACGCTGTGTGGCCAAGGTACAAGTCCTTTT
 W E N Q T L S L R H A V W P R Y K S F S
 1630 1650 1670
 CTGACTGCGAGCCAGATGACAACCACCTCAGCATTGTCACTTGGAGGAAGCCCCCTTCG
 D C E P D D N H L S I V T L E E A P F V
 1690 1710 1730
 TCATCGTAGAGGACATAGACCCCCTGACTGAGACCTGTGTGAGGAACACGGTGCCCTGTG
 I V E D I D P L T E T C V R N T V P C R
 1750 1770 1790
 GGAAGTTCTGTCAGATCAACAATTCAACCAACGAAGGGATGAATGTGAAGAAATGCTGCA
 K F V K I N N S T N E G M N V K K C C K

Figur 1 Forts.

1810	1830	1850
AGGGGTTCTGCATCGACATCCTCAAGAAGCTGTCCAGAACTGTGAAGTTCACCTATGACC		
G F C I D I L K K S R T V K F T Y D L		
1870	1890	1910
TCTACCTGGGIGACCAATGGGAAGCATGGGAAAAGGTTAACAATGTGTGGAATGGAATGA		
Y L V T N G K H G K K V N N V W N G M I		
1930	1950	1970
TAGGTGAAGTGGTCTATCAACGAGCAGTCATGGCTGTGGGCTCACTCACCATCAATGAGG		
G E V V Y Q R A V M A V G S L T I N E E		
1990	2010	2030
AGCGTTTCGGAAGTGGTGGACTTCTCGGTGCCCTTCGTGGAGACAGGAATCAGCGTCATGG		
R S E V V D F S V P F V E T G I S V M V		
2050	2070	2090
TCTCCAGGAGTAATGGCACTGTCTCCCCTTCTGCTTTCCTCGAACCCCTTCACTGCCTCCG		
S R S N G T V S P S A F L E P F S A S V		
2110	2130	2150
TCTGGGTGATGATGTTTGTGATGCTGCTCATCGTCTCAGCCATTGCTGTCTTCGTTTTTG		
W V M M F V M L L I V S A I A V F V F E		
2170	2190	2210
AATACTTCAGTCCTGTTGGATACAACAGAACTTAGCCAAGGGAAAGCTCCCCACGGGC		
Y F S P V G Y N R N L A K G K A P H G P		
2230	2250	2270
CTTCTTTTACTATTGGAAAAGCTATATGGCTCCTCTGGGGCCTGGTCTTCAACAATTCTG		
S F T I G K A I W L L W G L V F N N S V		
2290	2310	2330
TGCCTGTCCAGAATCCTAAAGGCACAACCAAGCATGCTGTGTCAGTGTGGGCCTTCT		
P V Q N P K G T T S K I M V S V W A F F		
2350	2370	2390
TTGCTGTCTATCTTCTGGCCAGTTACACAGCCAACCTGGCTGCCTTCATGATCCAGGAGG		
A V I F L A S Y T A N L A A F M I Q E E		
2410	2430	2450
AGTTTGTGGACCAAGTGACTGGCCTCAGTGACAAGAAGTTCAGAGACCTCATGACTATT		
F V D Q V T G L S D K K F Q R P H D Y S		
2470	2490	2510
CTCCACCTTTCGATTGTTGGGACGGTACCCAATGGAAGTACAGAGAGGAATATTCGTAACA		
P P F R F G T V P N G S T E R N I R N N		
2530	2550	2570
ACTACCCCTATATGCACCACTACATGACCAGATTCAACCAAGAGGGGAGTGGAGGATGCCT		
Y P Y M H Q Y M T R F N Q R G V E D A L		
2590	2610	2630
TGGTCAGCTTGAAAACCGGGAAGTTGGACGCTTTCATCTATGACGCAGCCGTCTTGAAC		
V S L K T G K L D A F I Y D A A V L N Y		
2650	2670	2690

Figur 1 Forts.

ACAAGGCCGGGAGGGATGAAGGCTGTAACTGGTGACCATTGGGAGCGGGTACATCTTTG
 K A G R D E G C K L V T I G S G Y I F A
 2710 2730 2750
 CTAGCACAGGCTATGGAATTGCGCTGCAGAAGGGCTCACCCTGGAAGAGGCAGATTGACC
 S T G Y G I A L Q K G S P W K R Q I D L
 2770 2790 2810
 TCGCTCTGCTCCAGTTTGTGGTGATGGTGAGATGGAGGAGCTGGAGACACTGTGGCTTA
 A L L Q F V G D G E M E E L E T L W L T
 2830 2850 2870
 CGGGCATCTGCCACAACGAGAAGAATGAGGTGATGAGTAGCCAGCTGGACATCGATAACA
 G I C H N E K N E V M S S Q L D I D N M
 2890 2910 2930
 TGGCGGGCGTGTCTACATGCTGGCTGCAGCCATGGCCCTCAGCCTCATCACCTTCATCT
 A G V F Y M L A A M A L S L I T F I W
 2950 2970 2990
 GGGAGCACCTCTTCTACTGGAAGCTGCGCTTCTGCTTCACAGGCGTGTGCTCTGACCGGC
 E H L F Y W K L R F C F T G V C S D R P
 3010 3030 3050
 CCGGGCTGCTCTTCTCCATCAGCAGGGGCATCTATAGTTGCATCCATGGGGTACACATTG
 G L L F S I S R G I Y S C I H G V H I E
 3070 3090 3110
 AAGAAAAGAAGAAATCTCCAGATTTCAATCTGACTGGATCACAGAGCAACATGCTAAAGC
 E K K K S P D F N L T G S Q S N M L K L
 3130 3150 3170
 TTCTTCGGTCAGCTAAAAACATCTCCAATATGTCCAACATGAACCTCTCAAGAATGGACT
 L R S A K N I S N M S N M N S S R M D S
 3190 3210 3230
 CACCTAAAAGAGCTACTGACTTCATTCAAAGAGGGTCACCTATTGTGGACATGGTTTCAG
 P K R A T D F I Q R G S L I V D M V S D
 3250 3270 3290
 ACAAGGGAAATTTGATATATTCAGACAACAGATCCTTTCAAGGGAAGGACAGTATATTG
 K G N L I Y S D N R S F Q G K D S I F G
 3310 3330 3350
 GAGACAACATGAATGAACTCCAAACATTTGTGGCCAACAGGCACAAGGATAATCTCAGTA
 D N M N E L Q T F V A N R H K D N L S N
 3370 3390 3410
 ACTATGTGTTTCAAGGACAGCATCCTCTCACTCTCAATGAGTCCAACCCTAACACAGTAG
 Y V F Q G Q H P L T L N E S N P N T V E
 3430 3450 3470
 AGGTGGCTGTGACACTGAATCCAAAGGGAACTCCCGACCCCGGCAGCTTTGGAAGAAAT
 V A V S T E S K G N S R P R Q L W K K S
 3490 3510 3530
 CCATGGAGTCTCTACGCCAGGATTCTCTAAACCAGAACCAGTCTCCAGAGGGATGAGA
 M E S L R Q D S L N Q N P V S Q R D E K

Figur 1 Forts.

3550	3570	3590
AGACTGCAGAGAATCGGACCCACTCGCTAAAGAGTCCTAGGSTATCTTCCAGAAGAGGTAG		
T A E N R T H S L S P R Y L P F E V A		
3610	3630	3650
CCCCTCTGACATTTTCAGAAACCTCAAGCCGGGCCACATGCCACAGGGAGCCAGATAACA		
H S D I S E T S S R A T C H R E P D N N		
3670	3690	3710
ATAAGAACCACAAGACCAAGGATAACTTCAACGGTCAATGGCCTCTAAGTATCCCAAGG		
K N H K T K D N F K R S M A S K Y P K D		
3730	3750	3770
ACTGTAGCGATGTTGACCGCACCTACATGAAAACCAAGCAAGTTCTCCCAGGGATAAGA		
C S D V D R T Y M K T K A S S P R D K I		
3790	3810	3830
TCTATACCAATTGATGGTGAGAAGGAGCCCAGCTTCCACTTAGATCCTCCTCAGTTTGTG		
Y T I D G E K E P S F H L D P P Q F V E		
3850	3870	3890
AGAATATAACCCTGCCTGAGAATGTGGGCTTCCCAGATACCTACCAAGATCACAATGAGA		
N I T L P E N V G F P D T Y Q D H N E N		
3910	3930	3950
ACTTCCGCAAGGGGGACTCCACACTGCCCATGAACAGGAACCCATTACATAATGAAGACG		
F R K G D S T L P M N R N P L H N E D G		
3970	3990	4010
GGCTTCCCAACAATGACCAATATAAACTCTATGCCAAGCACTTTACCTTGAAAGACAAGG		
L P N N D Q Y K L Y A K H F T L K D K G		
4030	4050	4070
GTTCCCCACACAGTGAGGGCAGTGATCGATACCGGCAGAACTCCACACATTGCAGAAGCT		
S P H S E G S D R Y R Q N S T H C R S C		
4090	4110	4130
GCCTTTTCGAATCTGCCACCTACTCAGGCCACTTTACCATGAGGTCTCCTTTCAAGTGTG		
L S N L P T Y S G H F T M R S P F K C D		
4150	4170	4190
ATGCCTGTCTGCGGATGGGGAATCTCTATGACATTGATGAAGACCAGATGCTTCAGGAGA		
A C L R M G N L Y D I D E D Q M L Q E T		
4210	4230	4250
CAGGTAACCCAGCTACTCGGAGGAGGTCTACCAGCAGGACTGGTCACAGAACAACGCC		
G N P A T R E E V Y Q Q D W S Q N N A L		
4270	4290	4310
TCCAGTTCCAGAAGAACAAGCTAAGGATTAAACGACAGCACTCCTATGATAACATTCTGG		
Q F Q K N K L R I N R Q H S Y D N I L D		
4330	4350	4370
ACAAACCCAGAGAGATAGACCTTAGCAGGCCCTCCCGGAGCATAAGCCTCAAGGACAGG		
K P R E I D L S R P S R S I S L K D R E		
4390	4410	4430

Figur 1 Forts.

AACGGCTACTGGAGGGCAACTTGTATGGGAGGCTGTTCACTGTCCCCCTCAGCAAACCTCT
R L L E G N L Y G S L F S V F S S K L L
4450 4470 4490

TGGGGAACAAAGCTCCCTTTTCCCCCAAGGTCTGGAGGACAGCAAGAGGAGCAAGTCTC
G N K S S L F P Q G L E D S K R S K S L
4510 4530 4550

TCTTGCCAGACCACGCCTCTGATAATCCTTTCTCCACACGTATGGGGATGACCAACGCT
L P D H A S D N P F L H T Y G D D Q R L
4570 4590 4610

TAGTTATCGGGAGATGTCCCTCGGACCCTTACAAACACTCATTGCCATCAGGCGGTAA
V I G R C P S D P Y K H S L P S Q A V N
4630 4650 4670

ATGACAGCTATCTTCGGTCATCCTTGAGGTCAACAGCATCATATTGCTCCAGGGACAGTC
D S Y L R S S L R S T A S Y C S R D S R
4690 4710 4730

GGGGCCACAGTGATGTGTATATTTTCAAGCATGTTATGCCCTTATGCTGCAATAAGAATA
G H S D V Y I S E H V M P Y A A N K N T
4750 4770 4790

CCATGTACTCTACCCCCAGGGTTTTAAATTCCTGCAGCAATAGACGAGTGTACAAGAAA
M Y S T P R V L N S C S N R R V Y K K M
4810 4830 4850

TGCCTAGTATCGAATCTGATGTTAAGATCTTCCATCAGTATTTATCTATAAGGAAACAT
P S I E S D V
4870 4890 4910

ATAGAATGGCCAACATTATAGAGGGTAAATGTTGGATGTCCGATAGCACCTACTAGGAG
4930 4950 4970

GAAGAGGGTACAGGGAGGTACTTTTTGTTGGCTCTTTTGACATGGCTCCATGCCATAAT
4990 5010 5030

CTTCCACTCAAGGAATCTTGTGAGATATGTGCTGAGCACAGCATATACCAGTAGGTGAA
5050 5070 5090

TCCTTAACCAAAAACAAATAAATACACATGGGCAAGTCTCCAGACATGGCGACTGGGCA
5110 5130

CGGCGGCAATAATGGTGATCAGACGGCGATGGTGACATTGTGGTT

Figur 2

10 30 50
TCCCCGGGCTCCCATCACCACCAACTGGAATCTGGGCTCTCCTGCCTCTCCACCCCCCCC
70 90 110
CCTTTTTGAGAAAGGAAGGTCTCCCCACCCCCCTTCCAGCACCATTCTTGGGTTC
130 150 170
TTCACCTCTAGGAAATCTCGGGGCTTGGCTCAATGGAGAAGCGCTTCTCGGGTCAAGCTG
190 210 230
CCTCTCCATCCCCGGCATCCAGCGGAGGCTCATCCGAAATACATTTCTTCTGCTCTGCA
250 270 290
AAGAGTCGTAGTGAATTCCTCAACCCGAGAGACTGATCATCTATCCTGCTTTGCAGAAAG
310 330 350
GAAATCTCTCAAACCCTCGACACCCGCCACCCCTCTCCGAGAGTGCCACCGCGGAGGTG
370 390 410
CTCAGAACCCTGAAGGGACGCTTTGGGAATGACCATCGTCTACGGAGGGAAGAGCCTGCC
430 450 470
CCCAGCTTCTCCACACAGAGACTCCTCTACTAAGCTCCAATAATTAAGAAAAAGAA
490 510 530
AAGAAAAAGATCAATCTGTAAATGCTGAAGACTCCTTAATATATATATATATATAT
550 570 590
ATTCGGGCTACTAACCTCACATGCACATGGGATAATGACTCTGGATTCTGCATTGTGAGC
610 630 650
TGCTCTCCACACCCTGAGATCCCCTCTTACATTATTTTCTTTGAATTTGCATCTC
670 690 710
GTCAAGACACAAGATTAAAAACCGAAATTTACTACACTGGATTTTAAATTTCTTCCGT
730 750 770
TCCTTTATCCTCCGTCTTTCTTATGTGGATATGCAAGCGAGAAGAGGAGCCCTGGATAT
790 810 830
CCCAACATGCTCTCTCCCTTAATCTGTCCGCTAGAGGTTTGGCGTCTACAAACCAAGAG
850 870 890
AGCCGACTAGCTGAAGATGAAGCCAGCGCAGAGTGCTGTTCCTCCCAAGTTCTGGTTGGT
M K P S A E C C S P K F W L V
910 930 950
GTGCGCGTCTTGGCCGTATCAGGCAGCAAGCTCGTTCCCAAGAGCCCCCAGCAT
L A V L A V S G S K A R S Q K S P P S I
970 990 1010
CGGCATCGCTGTCATCCTCGTGGGCACTTCAGACGAAGTGGCCATAAAGACGCCACGA
G I A V I L V G T S D E V A I K D A H E

Figur 2 Forts.

1030	1050	1070
GAAAGATGACTTCCATCATCTCTCAGTAGTTCCCGGGGAGCTCGTACCCATGAACGA K D D F H H L S V V P R V E L V M N E		
1090	1110	1130
AACTGACCCAAAGAGCATCATCCCCGTATCTGCGATCTTATGTCTGACCGGAAGATCCA T D P K S I I T R I C D L M S D R K I Q		
1150	1170	1190
GGGGGTGGTGTTCGCGGATGACACCGACCAAGAAGCCATCGCTCAGATCCTCGACTTCAT G V V F A D D T D Q E A I A Q I L D F I		
1210	1230	1250
TTCTGCTCAGACTCTCACCCCCATCCTGGGCATCCATGGGGGCTCATCTATGATAATGGC S A Q T L T P I L G I H G G S S M I M A		
1270	1290	1310
GGATAAGGATGAGTCCTCCATGTTCTTCCAGTTTGGCCCGTCTATCGAACAGCAAGCTTC D K D E S S M F Q F G P S I E Q Q A S		
1330	1350	1370
CGTCATGCTCAACATCATGGAAGAATATGACTGGTACATCTTTTCCATCGTCACCACCTA V M L N I M E E Y D W Y I F S I V T T Y		
1390	1410	1430
CTTCCCTGGCTACCAGGACTTTGTGAACAAGATCCGCAGTACCATCGAGAACAGCTTCGT F P G Y Q D F V N K I R S T I E N S F V		
1450	1470	1490
GGGCTGGGAGCTCGAGGAAGTCCCTCCTGCTAGACATGTCTCTGGACGATGGCGACTCTAA G W E L E E V L L L D M S L D D G D S K		
1510	1530	1550
GATTCAGAATCAGCTGAAGAAGCTCCAAAGCCCCATCATCTCCTTTATTGCACGAAGGA I Q N Q L K K L Q S P I I L L Y C T K E		
1570	1590	1610
GGAAGCCACCTACATTTTTGAAGTAGCTAACTCAGTTGGGCTGACTGGCTACGGCTACAC E A T Y I F E V A N S V G L T G Y G Y T		
1630	1650	1670
GTGGATTGTGCCGAGTCTGGTGGCCGGGATACGGACACGGTGCCTTCAGAGTTCCCCAC W I V P S L V A G D T D T V P S E F P T		
1690	1710	1730
GGGGCTTATCTCTGTGTCTTATGATGAATGGGACTATGGCCTTCCTGCCAGAGTGAGAGA G L I S V S Y D E W D Y G L P A R V R D		
1750	1770	1790
TGGAATTGCCATCATCACCACCTGCTGCCTCGGACATGCTGTCCGAACACAGTTTCATCCC G I A I I T T A A S D M L S E H S F I P		
1810	1830	1850
TGAGCCCAAGAGCAGTTGCTACAACACCCACGAGAAGAGGATCTACCAGTCTAACATGTT E P K S S C Y N T H E K R I Y Q S N M L		
1870	1890	1910

Figur 2 Forts.

GAATAGGTATCTGATCAATGTCACCTTTTGAAGGGAGAAACCTGTCCITCAGCGAAGATGG
N R Y L I N V T F E G R N L S F S E D G
1930 1950 1970

CTACCAGATGCATCCGAAGCTGGTGATAATCCTTCTGAACAAGGAGAGGAAGTGGGAGAG
Y Q M H P K L V I I L L N K E R K W E R
1990 2010 2030

GGTGGGGAAATGGAAGGACAAGTCCCTGCAGATGAAGTATTATGTGTGGCCTCGGATGTG
V G K W K D K S L Q M K Y Y V W P R M C
2050 2070 2090

TCCTGAGACTGAGGAGCAAGAGGATGACCATCTGAGCATTGTCACCTTGGAGGAGCGCC
P E T E E Q E D D H L S I V T L E E A P
2110 2130 2150

ATTTGTCAATTTGTGAAAGCGTGGACCTCTCAGTGGAACTTGCATGAGGAATACAGTCCC
F V I V E S V D P L S G T C M R N T V P
2170 2190 2210

GTGCCAGAAGCGCATCATCTCTGAGAATAAAACAGATGAGGAACCGGCTACATCAAAA
C Q K R I I S E N K T D E E P G Y I K K
2230 2250 2270

ATGCTGCAAGGGGTTCTGTATTGACATCCCTTAAGAAAATTTCTAAGTCTGTGAAGTTCAC
C C K G F C I D I L K K I S K S V K F T
2290 2310 2330

CTATGACCTTTACCTGGTGACCAATGGCAAGCACGGGAAGAAGATTAATGGGACCTGGAA
Y D L Y L V T N G K H G K K I N G T W N
2350 2370 2390

TGGCATGATCGGTGAGGTGGTCATGAAGAGGGCCTACATGGCAGTGGGATCACTAACTAT
G M I G E V V M K R A Y M A V G S L T I
2410 2430 2450

CAATGAAGAACGGTCAGAGGTGGTTGACTTCTCTGTACCCTTCATAGAACTGGCATCAG
N E E R S E V V D F S V P F I E T G I S
2470 2490 2510

TGTCATGGTATCTCGCAGCAATGGGACTGTGTACCTTCTGCCTTCTTAGAGCCATTCA
V M V S R S N G T V S P S A F L E P F S
2530 2550 2570

CGCTGACGTGTGGGTGATGATGTTTGTGATGCTGCTCATTTCTTCTGCGGTGGCTGTCTT
A D V W V M M F V M L L I V S A V A V F
2590 2610 2630

TGCTTTGAATACTTCAGCCCTGTGGGTTACAACAGGTGCCTAGCCGATGGCAGAGAGCC
V F E Y F S P V G Y N R C L A D G R E P
2650 2670 2690

AGGAGGCCCATCTTTACCATCGGCAAGCAATTTGGTTACTCTGGGGTCTGGTGTTTAA
G G P S F T I G K A I W L L W G L V F N
2710 2730 2750

CAACTCCGTACCTGTGCAGAACCCAAAGGGGACCACCTCCAAGATCATGGTGTGAGTGTG

Figur 2 Forts.

N S V P V Q N P K G T T S K I M V S V W
 2770 2790 2810
 GGCCTTCTTTGCTGTGCATTTTCCTGGCCAGCTACACTGCCAACTTAGCAGCCTTCATGAT
 A F F A V I F L A S Y T A N L A A F M I
 2830 2850 2870
 CCAAGAGGAGTATGTGGACCAGGTTTCTGGCCTGAGTGACAAGAAGTTCAGAGACCTAA
 Q E E Y V D Q V S G L S D K K F Q R P N
 2890 2910 2930
 TGACTTCTCACCCTTTTCCGCTTTGGGACTGTGCCCAATGGCAGCACAGAGAGGAATAT
 D F S P P F R F G T V P N G S T E R N I
 2950 2970 2990
 CCGTAATAACTATGCAGAAATGCATGCCATACATGGGAAAGTTCAACCAAAGGGGTGTAGA
 R N N Y A E M H A Y M G K F N Q R G V D
 3010 3030 3050
 TGATGCATTGCTCTCCCTGAAAACAGGGAAGCTTGATGCATTTCATCTATGATGCAGCTGT
 D A L L S L K T G K L D A F I Y D A A V
 3070 3090 3110
 GCTCAACTACATGGCTGGAAGGGACGAAGCTGCAAAGTGGTACCATTGGCAGTGGCAA
 L N Y M A G R D E G C K L V T I G S G K
 3130 3150 3170
 GGTCTTTGCTTCTACCGCTATGGCATTGCTATCCAAAAGGACTCCGGGTGGAAGCGCCA
 V F A S T G Y G I A I Q K D S G W K R Q
 3190 3210 3230
 GGTGGACCTGGCTATCCTGCAGCTGTTTGGAGATGGGGAGATGGAAGAAGTGGAAAGCTCT
 V D L A I L Q L F G D G E M E E L E A L
 3250 3270 3290
 CTGGCTCAGTGGCATTGGCCACAATGAGAAGATGAGGTGATGAGCAGCCAGCTGGACAT
 W L T G I C H N E K N E V M S S Q L D I
 3310 3330 3350
 CGACAATATGGCAGGTGTCTTCTATATGTTGGGGGAGCCATGGCCCTCAGCCTCATCAC
 D N M A G V F Y M L G A A M A L S L I T
 3370 3390 3410
 CTTTCATCTGTGAGCATCTGTTCTATTGGCAGTTCGGGCAATGCTTCATGGGTGTCTGTTT
 F I C E H L F Y W Q F R H C F M G V C S
 3430 3450 3470
 TGGCAAGCCTGGCATGGTCTTCTCCATCAGCAGAGGTATCTACAGCTGTATCCATGGGGT
 G K P G M V F S I S R G I Y S C I H G V
 3490 3510 3530
 AGCCATAGAGGAGCGCCAATCCGTGATGAAGTCCCCCACTGCCACCATGAACAACACCCA
 A I E E R Q S V M N S P T A T M N N T H
 3550 3570 3590
 CTCCAACATCCTACGCTTGCTCCGCACGGCCAAGAACATGGCCAACCTGTCTGGAGTAA
 S N I L R L L R T A K N M A N L S G V N

Figur 2 Forts.

3610 3630 3650
 CGGCTCCCCCTCAGAGTGCCCTGGACTTCATCCGCGAGAGTCTCCGTCTACGACATCTC
 G S P Q S A L D F I R R E S S V Y D I S
 3670 3690 3710
 TGAGCATCGTCGAGCTTCACGCATTGAGACTGCAAGTCTTACAATAACCCACCTGTGA
 E H R R S F T H S D C K S Y N N P P C E
 3730 3750 3770
 GGAAACCTGTTCAGTGACTACATTAGCGAGGTAGAGAGAACATTGGTTAACCTGCAGCT
 E N L F S D Y I S E V E R T F G N L Q L
 3790 3810 3830
 GAAGGACAGCAATGTGTACCAAGACCACTATCACCATCAACCACCGGCCACACAGCATCGG
 K D S N V Y Q D H Y H H H H R P H S I G
 3850 3870 3890
 CAGCACCAGCTCCATTGATGGGCTCTATGACTGTGACAACCCACCTTCACCACCCAGCC
 S T S S I D G L Y D C D N P P F T T Q P
 3910 3930 3950
 CAGGTCAATCAGCAAGAAACCCCTGGACATCGGCCTGCCCTCCTCCAAACATAGCCAGCT
 R S I S K K P L D I G L P S S K H S Q L
 3970 3990 4010
 CAGCGACCTGTATGGCAAGTTCTCTTTCAAGAGTGACCGCTACAGTGGCCACGACGACTT
 S D L Y G K F S F K S D R Y S G H D D L
 4030 4050 4070
 GATTCGATCGGATGTCTCCGACATCTCCACGCACACTGTACCTATGGGAACATCGAGGG
 I R S D V S D I S T H T V T Y G N I E G
 4090 4110 4130
 CAACGCAGCCAAAGAGGAGGAACAGCAGTATAAGGACAGTCTAAAGAAGCGGCCAGCCTC
 N A A K R R K Q Q Y K D S L K K R P A S
 4150 4170 4190
 GGCCAAATCGAGGAGGGAGTTTGATGAAATCGAGCTGGCCCTACCGTCGCCGACCACCCCG
 A K S R R E F D E I E L A Y R R R P P R
 4210 4230 4250
 CTCCCCGGACACACAAGCGCTACTTCAGGGACAAAGAAGGGCTCCGAGACTTCTACCTGGA
 S P D H K R Y F R D K E G L R D F Y L D
 4270 4290 4310
 CCAGTTCCGAACAAAGGAGAACTCGCCTCACTGGGAGCACGTGGACTTGACTGACATTTA
 Q F R T K E N S P H W E H V D L T D I Y
 4330 4350 4370
 CAAAGAACGCAGTGACGACTTCAAGCGAGATTTCGGTCAGTGGAGGTGGGCGCTGTACCAA
 K E R S D D F K R D S V S G G G P C T N
 4390 4410 4430
 CAGGTCTCACTCAAAACACGGAACGGGCGAGAAGCACGGAGTGGTAGGCGGGGTGCCTGC
 R S H L K H G T G E K H G V V G G V P A
 4450 4470 4490

Figur 2 Forts.

TCCTTGGGAGAAGAACCTGACCAATGTGGATTGGGAGGACCGGTCTGGGGGCAACTTCTG
P W E K N L T N V D W E D R S G G N F C
4510 4530 4550
CCGCAGCTGTCTTCCAAGCTGCACAATTACTCCTCGACGGTGGCAGGGCAGAACTCGGG
R S C P S K L H N Y S S T V A G Q N S G
4570 4590 4610
CCGGCAGGCCTGCATCAGATGTGAGGCCTGTAAGAAGGCTGGTAACCTGTACGACATCAG
R Q A C I R C E A C K K A G N L Y D I S
4630 4650 4670
CGAGGACAACTCCCTGCAGGAAGTGGACCAAGCCGGCTGCCCGGTGGCTGTGACATCCAA
E D N S L Q E L D Q P A A P V A V T S N
4690 4710 4730
CGCCTCCAGCACCAGTACCTCAAAGCCCGACTAATTCGAAGGCTCAGAAGAAGAATCG
A S S T K Y P Q S P T N S K A Q K K N R
4750 4770 4790
GAACAACTGCGCCGGCAGCATTCTACGACACCTTCGTGGACCTGCAGAGGAGGAGGC
N K L R R Q H S Y D T F V D L Q K E E A
4810 4830 4850
CGCCTTGGCCCCACGCAGCGTGAGCCTGAAGACAAGGGCCGATTTCATGGATGGGAGCCC
A L A P R S V S L K D K G R F M D G S P
4870 4890 4910
CTACGCCCATATGTTTGAGATGCCAGCTGGTGAGAGCTCCTTTGCCAACAGTCCTCAGT
Y A H M F E M P A G E S S F A N K S S V
4930 4950 4970
GCCCACTGCCGGACACCACACAACAACCCCGGCAGCGGTACATGCTCAGCAAGTCGCT
P T A G H H H N N P G S G Y M L S K S L
4990 5010 5030
CTACCCTGACCGGGTCACGCAAAACCTTTTCATCCCACTTTTGGGGATGACCAGTGCTT
Y P D R V T Q N P F I P T F G D D Q C L
5050 5070 5090
GCTTCACGGCAGCAAATCCTTACTTCTTCAGGCAGCCCACGGTGGCAGGGCGCTCAAAAAC
L H G S K S Y F F R Q P T V A G A S K T
5110 5130 5150
AAGGCCGGACTTCCGGGCCCTTGTCACCAATAAGCCAGTGGTGGTCACCTTCATGGGGC
R P D F R A L V T N K P V V V T L H G A
5170 5190 5210
TGTGCCAGGTCGTTTCCAGAAGGACATTTGTATAGGGAACAGTCCAACCCCTGTGTGCC
V P G R F Q K D I C I G N Q S N P C V P
5230 5250 5270
TAACAACAAAACCCAGGGCTTTCAATGGCTCCAGCAATGGACATGTTTATGAGAACT
N N K N P R A F N G S S N G H V Y E K L
5290 5310 5330
TTCTAGTATGAGTCTGATGTCTGAGTGAGGGAAGAGAGAGGTTAAGGTGGGTACGGG
S S I E S D V

Figur 2 Forts.
5350

AGGGATAGGGCTGTGGGCC

Figur 3

10 20 30 40 50
 GGGCGGCATCCAGGCCGGCCACCCGCCTGGTCCCCTCCGCGCCCGCTCCGGTGCCCGCC
 70 90 110
 GAGCTCGCAGCCAGCGTGCCAGCTCGCGGGGGCTGGCGCTGGGACGAGCACC GCCGAGAG
 130 150 170
 CTGTGCGGGCTTTGGGCGTGGGTGAAGCGCCCTTCCCGAAGCCGCTGGGGCAAGGAATC
 190 210 230
 GGGGCAGGGGCAAGAGCCAGAGCCGAGGCTGGGTTTGACCAGAGCGCGGGGAGTTGGAAA
 250 270 290
 GGAGACAGAGCTCCGAGAGCAAAAACCAGCTATAGCAGTTGGTGAGCTGGTCCCTGCTG
 310 330 350
 GGTACCTGCTGCTTCCACCGACCCCTCCCTCATTGGGGATTTCCTCCAGACGCTGCCCCC
 370 390 410
 AACGTCTTGCTTCCCTCAGCTCTCGTGCTCCAAAAGAAGGGTGGTAGGAAAAGGCCACG
 430 450 470
 GGAGAGCCTGCGCTCCGGTGCCCTGGGCCCTGGAAGCACCAGTTGGCAGCTGTGGTCTCTT
 490 510 530
 GGGGCTTAACCAGGACCCCGACGGCTGAGAGGAGAAGCCCAAGCCTTTGGCTGCCGGA
 550 570 590
 GGTTTTGTGCTTGGCCTAGGGAGGTTCTCTCTCTGTCTTGGCTGTGTGGTCTCTGC
 610 630 650
 CCTTCCTTCTCTCTGTTGTCCATCTACCTCTCTCTATGCTGCTCTGGTTCTCTGCAG
 670 690 710
 CCCTCCAGGTGACATGGGTGGGGCCCTAGGGCCCGCCCTGCTGCTCACTTCACTCCTTGG
 M G G A L G P A L L L T S L L G
 730 750 770
 TGCTTGGGCAAGGCTGGGCGCAGGGCAGGGAGAACAGGCCGTGACTGTGGCGGTGGTGT
 A W A R L G A G Q G E Q A V T V A V V F
 790 810 830
 TGGCAGCTCTGGGCCACTGCAGACCCAGGCCCGGACTCGTCTTACCTCCCAGAACTTCCT
 G S S G P L Q T Q A R T R L T S Q N F L
 850 870 890
 GGACCTGCCTCTGGAGATCCAGCCACTCACCGTAGGGGTCAACAATACCAATCCCAGCAG
 D L P L E I Q P L T V G V N N T N P S S
 910 930 950
 CATCCTCACCAAATCTGCGGGCTTCTGGGTGCCGCCCGTGTCCACGGCATCGTCTTTGA
 I L T Q I C G L L G A A R V H G I V F E
 970 990 1010

Figur 3 Forts.

D N V D T E A V A Q L L D F V S S Q T H
1030 1050 1070
CGTGCCCATCCTCAGCATCAGCGGAGCTCTGCTGTGGTCTCACCCTCAAGGAGCCAC
V P I L S I S G G S A V V L T P K E P T
1090 1110 1130
GTCCGCCTTCTACAGCTGGGCGTGTCCCTGGAGCAGCAGCTGCAGGTGCTGTTCAAGGT
S A F L Q L G V S L E Q Q L Q V L F K V
1150 1170 1190
GCTGGAGGAATACGACTGGAGCGCGTTCGCGGTCATCACCAGCCTGCATCCGGGCCACGC
L E E Y D W S A F A V I T S L H P G H A
1210 1230 1250
GCTCTTCCTCGAAGGCGTGC GCGCCGTCGCGGACCGCAGCTACCTGAGCTGGCGGCTGCT
L F L E G V R A V A D R S Y L S W R L L
1270 1290 1310
GGACGTGCTCAGCTGGAGCTAGGTCCGGTGGGCGCGAGCGCGCACTCAGCCGCTGCT
D V L T L E L G P G G P R A R T Q P L L
1330 1350 1370
ACGCCAGGTGACGCGCCGCTGCTGGTGGCTTACTGCTCCCGTGAAGAGGCCGAGGTGCT
R Q V D A P V L V A Y C S R E E A E V L
1390 1410 1430
CTTCGCTGAGGCTGCACAGCTGGCCTGGTGGGACCCGGGCACGTGTGGTTGGTACCTAA
F A E A A Q A G L V G P G H V W L V P N
1450 1470 1490
CCTGGCGCTGGGAAGCACCGACGCACCCCTGCAGCTTCCCGGTGGGCCTCATCAGTGT
L A L G S T D A P P A A F P V G L I S V
1510 1530 1550
GGTCACCGAGAGTTGGCGCCTTAGTCTACGCCAGAAGGTTCCGACGGAGTGGCCATTCT
V T E S W R L S L R Q K V R D G V A I L
1570 1590 1610
GGCCCTCGGTGCCCACAGCTACCGACGCCAGTACGGTACCCTGCCAGCCCCTGGCTGGGGA
A L G A H S Y R R Q Y G T L P A P A G D
1630 1650 1670
CTGCCGAAGCCACCCGGGACCCGTCAGCCCTGCTAGGGAGGCCTTCTACAGGCATCTGCT
C R S H P G P V S P A R E A F Y R H L L
1690 1710 1730
GAATGTACCTGGGAGGGCCGAGACTTCTTTTCAGCCCTGGTGGGTACCTGGTTCGGCC
N V T W E G R D F S F S P G G Y L V R P
1750 1770 1790
CACCATGGTTGTGATCGCCCTCAACCGGCACCGCCTCTGGGAGATGGTGGGACGGTGGGA
T M V V I A L N R H R L W E M V G R W D
1810 1830 1850
CCATGGAGTCTGTACATGAAGTATCCAGTATGGCCTCGCTACAGCACTTCTCTGCAGCC
H G V L Y M K Y P V W P R Y S T S L Q P

Figur 3 Forts.

1870	1890	1910
TGTGGTGGACAGCCGGCACCTGACAGTGGCCACACTGGAAGAAAAGCCCTTTGTCATTGT		
V V D S R H L T V A T L E E R P F V I V		
1930	1950	1970
GGAGAGCCCTGACCCTGGCAGGTGGCTGTGTCCCAACACCGTGCCCTGCCGCAGACA		
E S P D P G T G G C V P N T V P C R R Q		
1990	2010	2030
GAGCAACCAACCTTCAGCAGCGGGGATCTAACCCCTACACCAAGCTCTGTTGTAAGG		
S N H T F S S G D L T P Y T K L C C K G		
2050	2070	2090
CTTCTGCATCGACATCCTCAAAAAGCTGGCCAAGGTGGTCAAGTTCTCCTACGACTTGT		
F C I D I L K K L A K V V K F S Y D L Y		
2110	2130	2150
CCTGGTGACCAACGGCAAACACGGCAAGAGGGTTCGTGGTGTGTGGAACGGCATGATCGG		
L V T N G K H G K R V R G V W N G M I G		
2170	2190	2210
GGAGGTATACTACAAGCGGGCAGACATGGCCATCGGCTCCCTCACCATCAATGAGGAGCG		
E V Y Y K R A D M A I G S L T I N E E R		
2230	2250	2270
CTCTGAGATTATAGATTTCTCTGTGCCTTTTGTGGAGACCGGCATCAGTGTATGGTATC		
S E I I D F S V P F V E T G I S V M V S		
2290	2310	2330
AAGGAGCAACGGCACCGTCTCCCCCTCAGCTTTTCTGGAACCCCTACAGCCCTGCCGTGTG		
R S N G T V S P S A F L E P Y S P A V W		
2350	2370	2390
GGTGATGATGTTTCGTGATGTGTCTCACGGTGGTTGCCATCACTGTCTTCATGTTTCGAGTA		
V M M F V M C L T V V A I T V F M F E Y		
2410	2430	2450
CTTCAGCCCTGTCAGCTACAACCAGAACCTCACCAAGGGCAAGAACCTGTGGACCATC		
F S P V S Y N Q N L T K G K K P G G P S		
2470	2490	2510
TTTCACCATGGCAAGTCCGTGTGGTTGCTGTGGGCACTGGTCTTCAACAACCTCTGTTC		
F T I G K S V W L L W A L V F N N S V P		
2530	2550	2570
CATCGAGAACCCCGGGGTACCACCAGCAAGATCATGGTCCTGGTGTGGGCCTTCTTCGC		
I E N P R G T T S K I M V L V W A F F A		
2590	2610	2630
TGTCATCTTCTCGCTAGCTATACGGCCAATCTGGCGGCCTTCATGATCCAGGAGCAATA		
V I F L A S Y T A N L A A F M I Q E Q Y		
2650	2670	2690
CATCGACACTGTGTCGGGCCTTAGTGACAAGAAGTTTCAGCGGCCTCAAGACCAATACCC		
I D T V S G L S D K K F Q R P Q D Q Y P		
2710	2730	2750

Figur 3 Forts.

ACCCTTCGGTTTTGGCACGGTACCTAACGGCAGCACAGAGAGGAACATCCGTAGCAACTA
P F R F G T V P N G S T E R N I R S N Y
2770 2790 2810
CGGTGACATGCACACCCACATGGTCAAGTTCAACCAGCGCTCGGTGGAGGACGCTCTCAC
G D M H T H M V K F N Q R S V E D A L T
2830 2850 2870
AAGCCTGAAGATGGGGAAGCTGGACGCCTTCATCTATGATGCTGTGCTCAACTACAT
S L K M G K L D A F I Y D A A V L N Y M
2890 2910 2930
GGCGGGCAAGGACGAAGGCTGCAAGCTGGTCACCATTGGGTCTGGCAAAGTCTTTGCCAC
A G K D E G C K L V T I G S G K V F A T
2950 2970 2990
CACTGGCTATGGCATTGCCATGCAGAAAGACTCCCACTGGAAGCGGGCCATAGACCTGGC
T G Y G I A M Q K D S H W K R A I D L A
3010 3030 3050
ACTCCTGCAACTTCTGGGGGATGGAGAGACGCAGAAGCTGGAGACAGTGTGGCTCTCAGG
L L Q L L G D G E T Q K L E T V W L S G
3070 3090 3110
GATCTGCCAGAACGAGAAGAAATGAGGTGATGAGCAGCAAGCTGGACATTGACAACATGGC
I C Q N E K N E V M S S K L D I D N M A
3130 3150 3170
GGGGGTCTTCTACATGCTGTGGTGGCCATGGGACTGGCCCTTCTGGTCTTTGCCTGGGA
G V F Y M L L V A M G L A L L V F A W E
3190 3210 3230
GCACCTGGTCTACTGGAACCTTCGACACTCGGTGCCCAACTCATCCAGCTGGACTTCCT
H L V Y W K L R H S V P N S S Q L D F L
3250 3270 3290
GCTGGCTTTTACGAGGGGCATCTACAGCTGCTTCAACGGGGTACAGAGCCCTCCGAGTCC
L A F S R G I Y S C F N G V Q S L P S P
3310 3330 3350
CGCACGGCCGCCAGCCCGGATCTACCGCAGACTCAGCCAGGCCAATGTGCTGAAGAT
A R P P S P D L T A D S A Q A N V L K M
3370 3390 3410
GCTGCAGGCGGCCCCGAGACATGGTGAACAACCGGGACGTGAGCAGCTCTTTGGACCGCGC
L Q A A R D M V N T A D V S S S L D R A
3430 3450 3470
CACTCGCACCATCGAGAACTGGGGCAACAACCGCCGCGTGCCTGCTCCCACCGCCTCTGG
T R T I E N W G N N R R V P A P T A S G
3490 3510 3530
CCCGCGGTCTTCCACCCCGGGTCTCCGGGACAACCGAGCCCCAGCGGCTGGGGCCTCCT
P R S S T P G P P G Q P S P S G W G L L
3550 3570 3590
GGTGGGGGCCGCACCCCGCTAGCGCGCAGGGCCCCGCAGCCTCCGGCTCGCCCCGCGACG
V G A A P R

Figur 3 Forts.

3610 3630 3650
TGC GGGCCACCTTGTCCCGATGTGTCCCGACCATCCTGCAGGCACGCTTCGGACGCGCGG
3670 3690 3710
TGGCCGGTGCAGATTGGGCATCAGGGACCGCACGTCTCGGCTTCCGAGCGGCGCGCGCTC
3730 3750 3770
CCGGAGCGCTCTCTGTTGCCCGCGCACTGCCACTACAGTTCCTTCCCTCGAGCGGAGAGA
3790 3810 3830
TCCGGGCGCCCTACCTCCCGTTATTCCCGGAGCCCCCGAGCCCGACGACCTGCCTCTG
3850 3870 3890
CTCGGGCCGGAACAGCTGGCTCGGCGGGAAGCAATGCTGCGCGGCGCTGGGCCCCGGGGC
3910 3930 3950
CCGCGCGCTCGCCACGCTTCCTTGCCCAGCTCGGTGGTAGAAGCTTTCACTCGATCCAAC
3970 3990 4010
CCTCTGCCTGCCAGGTGTACCGGTCACGCCGTGTGCCTGCCCGTGCCCCAAAGCCGGCCA
4030 4050 4070
TCCTGCAGGCACTTGGCTCAGGCACAGTCGCTGAGGCTGCCGTCTACCCGGCGGCCTGT
4090 4110 4130
GTGGAGGGCTGTACCAGCATGGGGTGGCCACCTGGCAGCCAGACAGCACGTCTGCCTGC
4150 4170 4190
ACGCCCATAACCGCCTGCCGTTCTGTTGGGGAAGTGTCTGCCGTGACCCTCACCTGTAC
4210 4230 4250
CAGCCACAGCCCCCTGGCTCATTTGAACCTGGGAGCCTCCAGCACACAGAGTCAGGACCCCT
4270 4290 4310
GGGGCTAGGCACAGGCTACAGGGACAGTGGGGTGTGGAAGAGGTCAGCAGGGAAGCCTG
4330 4350 4370
TGGGACACAAGGTTTTCCAAGGTCCTGCACCTGGAGGCGGGTCTCCAGCCTGGAATCAGA
4390 4410 4430
AGTGTGAGGTACTGGCAGCTTTGGTTCCCTGCTGACTGGCTTCTGTGGCCGGCCTTGGC
4450 4470 4490
AGGTTTGGGGACAGGCCAGCTTGGGCTCCTCTGGCTTCTATTTTGAAATCCTGGCCATG
4510 4530 4550
GACCCAGTGAAAAGGATACTTCCAGGCCAGCTTTGACTTAGTGTGGGCTGGGATCT
4570 4590 4610
TGTTTCATCAATGACCTCTTGGGTGGTCACAGGGAGTAAAAATGTGTCCCTGTCCTGTT
4630 4650 4670
GTCAGCTAGTTCCTAGTTGTGGTTGCTGTGGCCTTGGGTGGGGACACAGAAATTGGAA

Figur 3 Forts.

4690

4710

4730

TCGAGGTTGGGGTGGGGCCATCCCACCTTCIITGGCCCAATAGCIGGGTTCTTTTCAT

No English titl available.

Patent Number: DE4216321
Publication date: 1993-11-18
Inventor(s): BACH ALFRED DR (DE); HERB ANNE (DE); MONYER HANNAH DR (DE); SEEBURG PETER H PROF DR (DE)
Applicant(s): BASF AG (DE)
Requested Patent: ☐ DE4216321
Application Number: DE19924216321 19920516
Priority Number (s): DE19924216321 19920516
IPC Classification: C12N15/11; C12N15/87; C12N15/63; C07K13/00; C12Q1/68; G01N33/50; G01N33/483; C12N15/10; C12N15/79; C12N15/88
EC Classification: C07K14/705K
Equivalents: MX9302841, ☐ WO9323536

Abstract

New sub-units of NMDA receptors and the DNA sequences that code for them are disclosed, as well as a process for producing DNA sequences and receptors and a process for identifying functional ligands for said receptor.

Data supplied from the esp@cenet database - l2